

REAADS® Anti-dsDNA Quantitative Test Kit
For In Vitro Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of IgG/IgM anti-dsDNA antibodies in human serum.

INTENDED USE

Detection and quantitation of IgG/IgM anti-double stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) antibodies as an aid in the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus (SLE).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ANTI-dsDNA TEST

Antibodies directed against deoxyribonucleic acid (DNA) were first detected in the serum of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) in the late 1950s.^{1,2,3,4} The presence of anti-dsDNA autoantibodies is one of the four highly specific serologic markers included in the 1982 ARA (ACR) revised criteria for the classification of SLE.⁵ The detection of elevated levels of anti-dsDNA antibodies and decreased serum levels of complement component C3 have been found to be 100% specific for SLE.⁶

Antibodies against native, or double stranded DNA (dsDNA) are found almost exclusively in patients with SLE, while antibodies against denatured, or single stranded DNA (ssDNA) can also be detected in patients with SLE as well as in patients with many other diseases, including rheumatic diseases and chronic infections.^{5,7,8}

The serum level of anti-dsDNA antibodies in patients with SLE correlates significantly with the level of disease activity, particularly when there is renal involvement.^{9,10,11} Therefore, the test for anti-dsDNA antibodies is useful for monitoring disease activity and the progress of therapy in patients with SLE.

A variety of commercially available tests incorporate different technologies for the detection of anti-dsDNA antibodies, including solution phase assays that use radiolabeled DNA, and indirect immunofluorescent assays in which anti-dsDNA antibodies bind to the DNA of the hemoflagellate *Crithidia luciliae*. Most of these techniques have inherent limitations. The radiolabeling process of the solution phase assays can denature segments of the DNA, reducing the specificity of these assays for anti-dsDNA antibodies.¹¹ The immuno-fluorescent *Crithidia* staining assay is labor intensive, and requires the subjective interpretation of the staining pattern.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum samples, calibrators, and controls are incubated in dsDNA coated microwells, allowing anti-dsDNA antibodies present in the samples to react with the immobilized antigen. After the removal of unbound serum proteins by washing, antibodies specific for human IgG and IgM labeled with horseradish peroxidase (HRP) are added forming complexes with dsDNA bound antibodies. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of a single solution containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the serum concentration of anti-dsDNA antibodies.

Results are obtained by reading the O.D. (optical density or absorbance) of each well in a spectrophotometer. A calibrator serum is provided, with the anti-dsDNA antibody concentration expressed in either AU/mL (arbitrary units that have been standardized against a Centers for Disease Control reference preparation) or in IU/mL (international units that have been standardized against the World Health Organization reference preparation). Dividing the concentration value of the calibrator by the absorbance value of that calibrator provides a conversion factor. The O.D. values of the controls and patient samples are multiplied by the conversion factor to obtain antibody concentration values, expressed in either AU/MI or IU/mL.

REAGENTS

Store at 2-8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Anti-dsDNA 96-microwell Test Kit contains the following reagents (**volumes may vary depending on kit size and configuration**):



- 12 1X8 stabilized dsDNA (from calf thymus) coated microwell strips with frame
- 60 mL Sample Diluent I (green solution); contains bovine calf serum*
- 0.250 mL Calibrator Serum; see vial label for anti-dsDNA antibody concentration in AU/mL and IU/mL*
- 0.250 mL Positive Control Serum; see vial label for anti-dsDNA antibody concentration range in AU/mL and IU/mL*
- 0.250 mL Normal Control Serum; see vial label for anti-dsDNA antibody concentration range in AU/mL and IU/mL*
- 15 mL anti-human IgG/IgM (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution); contains 0.01% thimerosal and gentamycin sulfate as preservatives
- 15 mL One Component Substrate (TMB and H₂O₂); ready to use
- 15 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid)
- 2 x 30 mL Wash Concentrate (33X PBS)

*** CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the calibrator and controls included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV and HIV I & 2 by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Certain components of this product contain sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.
6. One component substrate can cause irritation to the eyes and skin. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
7. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Irritant . Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum is the preferred sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the serum separated from the cells by centrifugation after clot formation. If not tested immediately, specimens should be stored at 2 to 8°C. If specimens are to be stored for more than 72 hours, they should be frozen at -20°C or below. Avoid repeated freezing and thawing. Do not use hemolyzed, icteric, or lipemic serum or plasma as these conditions may cause aberrant results. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

REAADS Anti-dsDNA Test Kit; see “Reagents” for a complete listing.

Materials Required but not Provided:

- Reagent grade water to prepare PBS wash solution (1L) and to zero or blank the plate reader during the final assay step
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 μ L and 1000 μ L, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system
- Disposable gloves
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (with a 650 nm reference if available)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously

Procedural Notes

1. Bring serum samples and kit reagents to room temperature (18-26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage as soon as possible.
2. All dilutions of calibrator, control, and test sera must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well can be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 μ L of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to “zero” or “blank” against air or a water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. No interference is caused should a water blank well receive PBS. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS can cause inconsistent color development of the substrate solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Carefully controlled timing of all steps is critical. All calibrators, controls, and samples must be added within a five minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18-26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid microbial and cross-contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use Tween 20 or other detergents in this assay.
13. Do not use kit components beyond expiration date.
14. Do not use kit components from different kit lot numbers.

Reagent Preparation

Wash Solution (PBS): Measure 30 mL of Wash Concentrate (33X PBS) and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS solution in the refrigerator at 2-8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or cross contamination.

Assay Procedure

1. One well should be run as a reagent blank control; Sample Diluent I without serum is added to the well. This well will be treated the same as sample wells in subsequent assay steps. The remaining wells are sufficient to test 46 patient samples run in duplicate wells or 92 patient samples run in single wells.
2. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
3. Prepare a 1:50 dilution of the calibrator, controls, and patient samples in Sample Diluent I (green solution); e.g. 10 μ L sample added to 490 μ L Sample Diluent I equals a 1:50 sample dilution.
4. Add 100 μ L of each diluted calibrator, control, and patient sample to the appropriate microwells.
5. Add 100 μ L of Sample Diluent I to the reagent blank well.
6. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
7. Wash 4 times with PBS. Each well should be filled with PBS per wash. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid after the final wash. Do not allow the wells to dry out between steps.
8. Add 100 μ L IgG/IgM HRP-Conjugated to the calibrator, controls, reagent blank and patient sample wells.
9. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert microwells to dump the enzyme-antibody conjugate solution.
10. Wash 4 times with PBS as in step 7. Use a snapping motion to drain the liquid, and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
11. Add 100 μ L Substrate to each well and incubate for 10 minutes at room temperature. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
12. Add 100 μ L of the Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add the Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue Substrate will turn yellow and colorless solution will remain colorless. Blank or zero the plate reader against air or a water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm (and 650 nm reference if dual beam). The O.D. values should be measured within 30 minutes after the addition of Stopping Solution.

Results

1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of the calibrator, controls, and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value (either AU/mL or IU/mL) of the calibrator serum (printed on the vial label) by the O.D. or mean O.D. of the calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the O.D. or mean O.D. for each of the controls and patient samples by the conversion factor to obtain a concentration value in AU/mL or IU/mL.

$$\begin{aligned} \text{Conversion Factor} &= \frac{\text{Anti-dsDNA concentration of the calibrator}}{\text{Absorbance value of the calibrator (O.D.)}} \\ \text{Anti-dsDNA concentration of sample} &= \text{Conversion Factor} \times \text{Absorbance of the sample (O.D.)} \end{aligned}$$

- The conversion factor must be calculated for the calibrator for each assay run. Using a conversion factor from another assay will invalidate the results.
- Samples with anti-dsDNA values greater than 100 AU/mL may be reported as “greater than 100 AU/mL” or greater than 450 IU/mL may be reported as “greater than 450 IU/mL”.

Quality Control

- The O.D. value of the calibrator should be at least 0.400 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator O.D. readings of less than 0.400 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
- The O.D. of the reagent blank should be ≤ 0.100 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.100 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
- The anti-dsDNA values obtained for the control sera should be within the ranges indicated on the container labels. Occasional small deviations outside these ranges are acceptable.
- O.D. values for duplicates, if run, of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
- Each laboratory should periodically determine their own normal cut-off values for the appropriate population of patients. See Expected Values, as an example.
- Assure that all quality control parameters have been met before reporting test results.

EXPECTED VALUES

Normal Range: Less than 26 AU/mL
or
Less than 117 IU/mL

The normal cut-off was defined as the mean AU/mL or IU/mL value plus two standard deviations from testing a population of healthy blood donors serum samples.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

NOTE: All performance characteristics were determined by using duplicate well determinations.

Clinical Specificity

Serum samples from 90 healthy blood donors were assayed for the presence of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies. The clinical specificity of the test was 98%.

Clinical Sensitivity

Serum samples from 100 individuals diagnosed as having SLE were assayed. Patients with both active and inactive disease were included. Sixty-five (65%) of these samples were positive for anti-dsDNA antibodies. The expected prevalence of elevated levels of anti-dsDNA antibodies in this group (SLE with varying levels of disease activity) is 50-75%.⁴

Precision

Two (2) samples with known anti-dsDNA antibody concentration values (one low and one high) were assayed in 32 replicates on three different occasions. The intraassay and interassay coefficients of variation (CV) are presented in the table below. The reported intraassay CV is the mean of the three separate intraassay CVs.

<u>Sample</u>	<u>Mean Intraassay CV</u>	<u>Interassay CV</u>
Low (25.8 AU/mL or 116.1 IU/mL)	8.6%	8.8%
High (52.1 AU/mL or 234.5 IU/mL)	6.4%	9.8%

LIMITATIONS OF THE TEST

The anti-dsDNA concentration values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. An elevated serum level of anti-dsDNA antibodies is only one of 11 criteria to be considered for a diagnosis of SLE.¹ Some apparently normal individuals and individuals with other rheumatic diseases may produce measurable amounts of anti-dsDNA antibodies; however, the levels are generally much lower than in patients with SLE.⁸

Warranty

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone +1-303-457-4345, fax +1-303-457-4519 or contact a Corgenix authorized distributor.

REAADS® Anti-dsDNA Quantitative Test Kit**In-vitro-Diagnostikum**

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) für die quantitative Bestimmung von IgG/IgM-Anti-dsDNA-Antikörpern in Humanserum.

ANWENDUNGSGEBIET

Nachweis und quantitative Bestimmung von IgG/IgM-Anti-dsDNA-Antikörpern (dsDNA = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure) als Hilfsmittel bei Diagnose und Management des systemischen Lupus erythematoses (SLE).

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. In dsDNA-beschichteten Mikrovertiefungen werden verdünnte Serumproben, Kalibratoren und Kontrollen inkubiert, damit die in den Proben vorhandenen Anti-dsDNA-Antikörper mit dem immobilisierten Antigen reagieren. Nach Auswaschen der ungebundenen Serumproteine werden Antikörper zugegeben, die mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert und spezifisch für Human-IgG und -IgM sind, und mit den dsDNA-gebundenen Antikörpern Komplexe bilden. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym- Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) enthält, als chromogenes Substrat bestimmt. In den Vertiefungen entwickelt sich eine Farbe mit einer der Konzentration der Anti-dsDNA- Antikörper im Serum proportionalen Intensität.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bzw. Extinktion in allen Vertiefungen mit einem Spektrophotometer. Das mitgelieferte Kalibratorserum enthält Anti-dsDNA-Antikörper, deren Konzentration entweder als AU/ml (Arbitrary Units, standardisiert gegen eine Referenzzubereitung der Centers for Disease Control) oder als IE/ml (Internationale Einheiten, standardisiert gegen eine Referenzzubereitung der Weltgesundheitsorganisation WHO) ausgedrückt ist. Die Division der Konzentration des Kalibrators durch die Extinktion des Kalibrators ergibt einen Umrechnungsfaktor. Die OD-Werte der Kontrollen und Patientenproben werden mit diesem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die in AU/ml oder IE/ml ausgedrückten Antikörperkonzentrationen zu erhalten.

REAGENZIEN

Bei 2-8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Anti-dsDNA-Testkit mit 96 Mikrovertiefungen enthält die folgenden Reagenzien (**Volumen können je nach Größe und Konfiguration des Kits variieren**):

- 12 mit stabilisierter dsDNA (aus Kälberthymus) beschichtete Mikrotiterstreifen mit Rahmen, 1X8
- 60 ml Probenverdünner I (grüne Lösung); enthält Kälberserum*
- 0,250 ml Kalibratorserum; die Konzentration der Anti-dsDNA-Antikörper ist in AU/ml und IE/ml auf dem Fläschchenetikett angegeben*
- 0,250 ml Positivkontrollserum; der Konzentrationsbereich der Anti-dsDNA-Antikörper ist in AU/ml und IE/ml auf dem Fläschchenetikett angegeben*
- 0,250 ml Normalkontrollserum; der Konzentrationsbereich der Anti-dsDNA-Antikörper ist in AU/ml und IE/ml auf dem Fläschchenetikett angegeben*
- 15 ml Antihuman-IgG/IgM-Antikörperlösung (Ziege), HRP-konjugiert (rote Lösung); enthält 0,01% Thimerosal und Gentamycinsulfat als Konservierungsmittel
- 15 ml Einkomponentensubstrat (TMB und H₂O₂); gebrauchsfertig
- 15 ml Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure)
- 2 x 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS)

*** ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung der in diesem Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV und HIV I und II reagierten. Trotzdem sollten alle Humanblutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Bestimmte Bestandteile dieses Produkts enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Azidhaltige Lösungen müssen beim Ausgießen in den Abfluss mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in den Wasserrohren zu vermeiden.
6. Das Einkomponentensubstrat kann Augen- und Hautreizungen verursachen. Absorption durch die Haut ist möglich. Beim Umgang mit dem Substrat stets Handschuhe tragen und anschließend gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
7. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46)

 Reizend. Biologisches Risiko .

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Serum ist die bevorzugte Probenmatrix. Vollblut sollte mittels Venenpunktion gewonnen und nach der Gerinnung zur Trennung der Zellen vom Serum zentrifugiert werden. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2-8°C aufzubewahren. Wenn die Proben länger als 72 Stunden nicht analysiert werden, sind sie bei -20°C oder darunter aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Hämolyisiertes, ikterisches oder lipämisches Serum oder Plasma darf nicht verwendet werden, da dies die Ergebnisse verfälschen kann. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, sollten vor dem Test durch Zentrifugation geklärt werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien

REAADS Anti-dsDNA-Testkit; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der PBS-Waschlösung (1 l) und zum Nullabgleich des Platten-Lesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten zur Abgabe von Volumen zwischen 5 und 1000 µL mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit etwas zurückgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm (mit 650 nm als Referenzwellenlänge, sofern verfügbar)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Zellen gleichzeitig beschickt werden können

Hinweise zur Durchführung

1. Serumproben und Kitreagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18-26 °C) bringen und gut durchmischen– **Schaumbildung vermeiden**. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren dürfen erst kurz vor dem Bestimmungsansatz verdünnt werden.
3. Für jeden Testlauf kann auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. In diese Vertiefung dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden in diese Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser pipettiert. Das Plattenlesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritze mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Durch Füllen einer Vertiefung für den Substratleerwert mit PBS wird der Assay nicht gestört. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn überschüssiges PBS nicht restlos entfernt wird, kann es zu einer ungleichmäßigen Farbentwicklung in der Substratlösung kommen.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichförmigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Vertiefungen.
7. Die Zeitangaben müssen bei allen Schritten sorgfältig eingehalten werden. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von 5 Minuten zugefügt werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit dem Ende der Reagenzien- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der Raumtemperatur (18-26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der primären Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine mikrobielle Verunreinigung und eine Kreuzkontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Kein Tween 20 oder andere oberflächenaktive Stoffe bei diesem Test verwenden.
13. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
14. Die Reagenzien verschiedener Kit-Chargen nicht miteinander vermischen.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung (PBS): 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS) abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete PBS-Lösung im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Eine Vertiefung sollte für den Blindversuch verwendet werden. In diese Vertiefung wird der Probenverdünner I ohne Serum pipettiert. Diese Vertiefung wird in den folgenden Testschritten wie Probenvertiefungen behandelt. Die verbleibenden Vertiefungen reichen zur Analyse von 46 Patientenproben in Doppelbestimmungen in je zwei Vertiefungen oder 92 Patientenproben in je einer Vertiefung aus.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und in dem mitgelieferten Säckchen aufbewahren.
3. Eine 1:50-Verdünnung von Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben in Probenverdünner I (grüne Lösung) herstellen; z. B. 10 µl Probe plus 490 µl Probenverdünner I ergibt eine 1:50-Verdünnung.

4. Von jeder Verdünnung (Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben) je 100 µl in die jeweiligen Mikrovertiefungen geben.
5. In die für den Blindversuch vorgesehene Vertiefung 100 µl Probenverdünner I geben.
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
7. Viermal mit PBS waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschvorgang mit PBS gefüllt werden. Nach jedem Waschschritt wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Die Halterung muss in der Mitte, oben und unten zusammengedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrovertiefungen beim Waschen zu vermeiden. Nach dem letzten Waschen auf saugfähigem Papier abtupfen, um die letzten Reste der Waschflüssigkeit zu entfernen. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Schritten nicht austrocknen.
8. In die Vertiefungen für Kalibrator, Kontrollen, Blindwert und Patientenproben jeweils 100 µl IgG/IgM-HRP-Konjugat geben.
9. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach abgeschlossener Inkubation die Lösung mit Enzym-Antikörperkonjugat durch sorgfältiges Umdrehen der Mikrovertiefungen auslaufen lassen.
10. Viermal wie in Schritt 7 beschrieben mit PBS waschen. Nach dem letzten Waschvorgang durch eine rasche Bewegung die Flüssigkeit herausschleudern und auf saugfähigem Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
11. In jede Vertiefung 100 µl Substrat geben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
12. Zum Anhalten der Enzymreaktion in jede Vertiefung 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) geben. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Die blaue Substratlösung schlägt nach gelb um, während bisher farblos gebliebene Lösungen weiterhin farblos bleiben. Das Plattenlesegerät gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung nullabgleichen. Die optische Dichte (OD) aller Vertiefungen bei 450 nm ablesen (und bei 650 nm als Referenzwellenlänge bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers). Die OD-Werte sollten innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmt werden.

Ergebnisse

1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Die Konzentration (in AU/ml oder IE/ml) des Kalibratorserums (auf dem Fläschchenetikett aufgedruckt) durch den OD-Wert oder den OD-Mittelwert dividieren, um den Umrechnungsfaktor zu erhalten.
3. Den OD-Wert oder den OD-Mittelwert für jede Kontrolle oder Patientenprobe mit dem Umrechnungsfaktor multiplizieren, um die Konzentration AU/ml oder IE/ml zu erhalten.

<p>Umrechnungsfaktor =</p> $\frac{\text{Anti-dsDNA-Konzentration des Kalibrators}}{\text{Extinktion des Kalibrators (OD)}}$ <p>Anti-dsDNA-Konzentration der Probe =</p> $\text{Umrechnungsfaktor} \times \text{Extinktion der Probe (OD)}$
--

4. Der Umrechnungsfaktor muss für den Kalibrator für jeden Testlauf berechnet werden. Verwendung eines Umrechnungsfaktors aus einem anderen Test führt zu ungültigen Ergebnissen.
5. Proben mit Anti-dsDNA-Werten von über 100 AU/ml können als „über 100 AU/ml“ und von über 450 IE/ml als „über 450 IE/ml“ angegeben werden.

Qualitätskontrolle

1. Der OD-Wert des Kalibrators sollte mindestens 0,400 betragen, um sicherzustellen, dass der Kit ordnungsgemäß funktioniert. Ist die OD der Kalibratoren niedriger, so ist dies ein Hinweis dafür, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Wenn das Spektrophotometer gegen Wasser auf null gestellt wurde, muss die OD des Blindversuchs $\leq 0,100$ sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollserien erhaltenen Anti-dsDNA-Werte sollten innerhalb der auf dem Behältnisetikett angegebenen Wertebereiche liegen. Gelegentliche geringe Abweichungen von diesem Bereich sind gestattet.
4. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen, sofern durchgeführt, von Kontrollen oder Patientenproben um nicht mehr als 20% vom OD-Mittelwert abweichen.
5. Jedes Labor sollte regelmäßig seine eigenen Grenzwerte für die jeweilige Patientenpopulation festlegen. Ein Beispiel findet sich im Abschnitt Normalwerte.
6. Bevor die Analyseergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind.

NORMALWERTE

Normalbereich: Weniger als 26 AU/ml
Oder
Weniger als 117 IE/ml

Der normale Schwellenwert wurde als mittlerer AU/ml-Wert bzw. IE/ml-Wert plus zwei Standardabweichungen aus den Tests von Serumproben einer Population gesunder Blutspender festgelegt.

GRENZEN DES TESTS

Die mit diesem Assay erhaltenen Anti-dsDNA-Konzentrationen sind ausschließlich als diagnostisches Hilfsmittel vorgesehen. Jeder Arzt muss diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten, der körperlichen Untersuchung sowie den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretieren. Erhöhte Serumspiegel an Anti-dsDNA-Antikörpern sind lediglich eines von 11 Kriterien, die bei der Diagnose des SLE zu berücksichtigen sind.¹ Bei einigen augenscheinlich normalen Personen und Personen mit anderen rheumatischen Erkrankungen können messbare Mengen von Anti-dsDNA-Antikörpern nachgewiesen werden, die Spiegel sind in der Regel jedoch geringer als bei Patienten mit SLE.⁸

Garantie

Dieses Produkt wird mit der Garantie geliefert, dass es wie in dieser Packungsbeilage beschrieben funktioniert. Corgenix Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen bezüglich der Handelbarkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck und haftet in keinem Fall für Folgeschäden.

Unseren technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661 bzw. außerhalb der USA unter +1-303-457-4345. Fax: +1-303-457-4519. Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

REAADS® Anti-dsDNA Quantitative Test Kit**Pour utilisation diagnostique in vitro**

Dosage immunoenzymatique (ELISA) pour la détermination quantitative des anticorps IgG/IgM anti-dsDNA dans le sérum humain.

UTILISATION ENVISAGÉE

Détection et quantification des anticorps IgG/IgM anti-acide désoxyribonucléique bicaténaire (dsDNA) à titre d'aide au diagnostic et au traitement du lupus érythémateux systémique (LES).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Des sérums échantillons, étalons et de contrôle dilués sont incubés dans des micropuits enduits de dsDNA, laissant les anticorps anti-dsDNA présents dans l'échantillon réagir avec l'antigène immobilisé. Après élimination par lavage des protéines non liées du sérum, des anticorps spécifiques de IgG et IgM humaines marqués à la peroxydase du raifort (PR) sont ajoutés pour former des complexes avec les anticorps liés à dsDNA. Après un deuxième lavage, le conjugué enzyme-anticorps lié est dosé par addition d'une unique solution contenant de la tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à titre de substrat chromogène. La couleur se développe dans les puits à une intensité proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-dsDNA dans le sérum.

Le résultat s'obtient par lecture de la D.O. (densité optique ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Un sérum étalon est fourni, dont la concentration d'anticorps anti-dsDNA est exprimée soit en unités AU/ml (unité arbitraire normalisée sur une préparation de référence du Centers for Disease Control [Centres de contrôle des maladies]), soit en UI/ml (unité internationale normalisée sur une préparation de l'Organisation mondiale de la santé). La division de la valeur de la concentration de l'étalon par la valeur de l'absorbance de cet étalon donne un facteur de conversion. La multiplication des valeurs de D.O. des contrôles et des échantillons par le facteur de conversion donne les valeurs des concentrations d'anticorps, exprimées en unités soit AU/ml, soit UI/ml.

RÉACTIFS

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.

Chaque kit de test Anti-dsDNA REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants **(les volumes peuvent varier selon la taille et la configuration du kit)**:

- 12 1X8 barrettes de micropuits enduites de dsDNA (de thymus de veau) stabilisé, avec cadre
- 60 ml de tampon I pour échantillon (solution verte) ; contient du sérum de veau*
- 0,250 ml de sérum étalon ; voir l'étiquette du flacon pour la concentration d'anticorps anti-dsDNA en AU/ml et UI/ml*
- 0,250 ml de sérum positif de contrôle ; voir l'étiquette du flacon pour la plage de concentration d'anticorps anti-dsDNA en AU/ml et UI/ml*
- 0,250 ml sérum normal de contrôle ; voir l'étiquette du flacon pour la plage de concentration d'anticorps anti-dsDNA en AU/ml et UI/ml*
- 15 ml de solution de conjugué anticorps anti-IgG/IgM humaine (caprin)-PR (solution rouge) ; contient 0,01 % de thimérosal et de gentamycine à titre de conservateurs
- 15 ml de substrat à un composant (TMB et H₂O₂) prêt à l'emploi
- 15 ml de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N)
- 2 x 30 ml de concentré de lavage (33x SPTP)

*** ATTENTION : Contient de l'azide de sodium**

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique in vitro

1. Les produits d'origine humaine utilisés pour préparer l'étalon et les contrôles inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAg, anti-HCV et anti-HIV-I & II selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons patient, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants de ce produit contiennent de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.
6. La solution substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption à travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources de chaleur. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
7. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :

Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Irritant . Risque biologique .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Réaliser les dosages sur sérum de préférence. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le sérum immédiatement séparé des cellules par centrifugation après la formation du caillot. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20 °C ou moins. Éviter de décongeler-recongeler. De même, ne pas utiliser des plasmas ou des sérums hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni

Kit de test Anti-dsDNA REAADS ; voir « Réactifs » pour la liste complète.

Matériel requis mais non fourni

- Eau pure pour analyse (1 l) pour préparer la solution mère SPTP et pour mettre à zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 µl et 1 000 µl, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants à usage unique
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire la densité optique à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanal capables d'alimenter 8 puits simultanément

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de sérum et les réactifs à température ambiante (18 à 26 °C) et bien agiter avant l'emploi ; éviter la **formation de mousse**. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur.
2. Diluer les étalons, les contrôles et les tests de sérum ou de plasma extemporanément.
3. Un unique puits d'eau à blanc peut être installé sur chaque plaque pour chaque série. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être mis à zéro ou « à vide » sur l'air ou sur un puits d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. La présence de SPTP dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de microplaque.
5. **IMPORTANT** : L'élimination imparfaite des résidus SPTP risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de distribuer dans 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Il est impératif d'ajouter en moins de 5 minutes tous les étalons, contrôles et échantillons. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Pour toutes les incubations, la période d'incubation débute dès que l'ajout du réactif ou de l'échantillon est terminé.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26°C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination microbienne ou croisée des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser de Tween 20 ou d'autres détergents dans ce dosage.
13. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de leur date de péremption.
14. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de lots différents.

Préparation des réactifs

Solution mère (SPTP) : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (SPTP 33x) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution de SPTP inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.

Procédure de dosage

1. Un puits doit être utilisé pour le réactif à blanc : ajouter au puits du tampon pour échantillon I sans sérum. Ce puits sera traité de la même manière que les puits d'échantillons dans les étapes de dosage ultérieures. Les puits restants suffisent pour doser 46 échantillons patient dans des puits en double ou 92 échantillons dans des puits individuels.
2. Retirer du cadre toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Préparer une dilution 1/50 de l'étalon, des contrôles et des échantillons patient dans du tampon pour échantillon I (solution verte) : par ex. l'ajout de 10 µl d'échantillon à 490 µl tampon pour échantillon I équivaut à une dilution 1/50 de l'échantillon.
4. Ajouter 100 µl de chaque dilution d'étalon, de contrôle et d'échantillon patient aux micropuits appropriés.
5. Ajouter 100 µl de tampon pour échantillon I au puits de réactif à blanc.

6. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
7. Laver 4 fois au SPTP. Chaque puits doit être rempli de SPTP à chaque lavage. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Faire pression sur le centre de la partie supérieure et de la partie inférieure du cadre afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide de lavage après le lavage final. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
8. Ajouter 100 µl de conjugué IgG/IgM-PR aux puits de l'étalon, des contrôles, du réactif à blanc et des échantillons patient.
9. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits pour jeter la solution de conjugué enzyme-anticorps.
10. Laver 4 fois au SPTP ainsi que décrit à l'étape 7. Après le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et éponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
11. Ajouter 100 µl de substrat à chaque puits et incuber pendant 10 minutes à température ambiante. Ajouter la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
12. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution incolore reste incolore. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur l'air ou sur un puits d'eau à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm (et à la référence 650 nm si à double faisceau). La D.O. doit être mesurée dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Résultats

1. Calculer les D.O. moyennes si l'étalon, les contrôles et les échantillons patient ont été traités en double.
2. Diviser la valeur de la concentration (en AU/ml ou UI/ml) du sérum étalon (imprimé sur l'étiquette du flacon) par sa D.O. ou sa D.O. moyenne pour obtenir le facteur de conversion.
3. Multiplier D.O. ou la D.O. moyenne de chacun des contrôles et échantillons patient par le facteur de conversion pour obtenir la valeur de la concentration en AU/ml ou UI/ml.

<p>Facteur de conversion =</p> $\frac{\text{Concentration Anti-dsDNA de l'étalon}}{\text{Densité optique de l'étalon (D.O.)}}$ <p>Concentration Anti-dsDNA de l'échantillon =</p> $\text{Facteur de conversion X Absorbance de l'échantillon (D.O.)}$

4. Le facteur de conversion doit être calculé pour l'étalon à chaque série de dosages. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage invaliderait les résultats.
5. Un échantillon dont la valeur anti-dsDNA dépasse 100 AU/ml peut être signalé en tant que « supérieur à 100 AU/ml » ; s'il dépasse 450 UI/ml, en tant que « supérieur à 450 UI/ml ».

Contrôle qualité

1. La D.O. de l'étalon doit être d'au moins 0,400 pour confirmer le bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,400 indique que le kit est périmé.
2. La D.O. obtenue pour le réactif à blanc doit être $\leq 0,100$ lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,100 peut indiquer que le réactif a été contaminé ou que la plaque a été mal lavée.
3. Les valeurs anti-dsDNA obtenues pour les sérums de contrôle doivent être dans les plages indiquées sur les étiquettes des conteneurs. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Les valeurs de densité optique pour les doubles, si analysés, des contrôles ou des échantillons patient ne doivent pas différer de plus de 20 % de la valeur moyenne des échantillons dont les résultats de densité optique sont supérieurs à 0,200.
5. Chaque laboratoire doit confirmer régulièrement ses valeurs seuil normales de la population de patients appropriée. Voir Valeurs prévues, à titre d'exemple.
6. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis avant de communiquer les résultats des tests.

VALEURS PRÉVUES

Plage normale : Inférieur à 26 AU/ml
ou
Inférieur à 117 UI/ml

Le seuil normal a été défini en prenant la valeur AU/ml ou UI/ml moyenne plus deux écarts-type du dosage d'échantillons de sérum provenant d'une population de donneurs sains.

LIMITATIONS DU TEST

Les valeurs de concentration anti-dsDNA obtenues avec ce dosage ne constituent qu'une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Un taux sérique élevé d'anticorps anti-dsDNA n'est qu'un des 11 critères à prendre en compte dans un diagnostic de LES.¹ Certains sujets apparemment normaux et des sujets présentant une autre maladie rhumatismale peuvent produire des quantités mesurables d'anticorps anti-dsDNA ; ces taux sont toutefois bien plus bas qu'en présence de LES.⁸

Garantie

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe au conditionnement. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis : téléphone 1-800-729-5661. Au dehors des États-Unis : téléphone +1-303-457-4345 ; télécopie +1-303-457-4519 ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

REAADS® Anti-dsDNA Quantitative Test Kit

Para uso diagnóstico in vitro

Un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG/IgM anti-dsADN en suero humano.

INDICACIONES

Detección y cuantificación de anticuerpos IgG/IgM antiácido desoxirribonucleico bicatenario (dsADN) como ayuda en el diagnóstico y tratamiento del lupus eritematoso diseminado (LED).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las diluciones de las muestras de suero, los calibradores y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de dsADN, lo que permite que los anticuerpos anti-dsADN presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Tras la eliminación, mediante lavado, de las proteínas no unidas, se añaden anticuerpos específicos para IgG e IgM humanas marcados con peroxidasa (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos al dsADN. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado enzima retenida-anticuerpo se analiza añadiendo una solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos anti-dsADN.

Los resultados se obtienen leyendo la D.O. (densidad óptica o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministra un suero calibrador con la concentración de anticuerpos anti-dsADN expresada en UA/ml (unidades arbitrarias que se han estandarizado respecto a una preparación de referencia de los Centers for Disease Control estadounidenses) o en UI/ml (unidades internacionales que se han estandarizado respecto a la preparación de referencia de la Organización Mundial de la Salud). Dividiendo el valor de la concentración del calibrador por el valor de absorbancia de dicho calibrador se obtiene un factor de conversión. Los valores de D.O. de los controles y las muestras de pacientes se multiplican por el factor de conversión para obtener las concentraciones de anticuerpos, expresadas en UA/ml o UI/ml.

REACTIVOS

Consérvelos a entre 2 y 8 °C. No los congele.

Cada equipo de determinación de anticuerpos anti-dsADN REAADS de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos (**los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo**):

- 12 tiras de 8 micropocillos recubiertos de dsADN (de timo de ternero) estabilizado cada una, con gradilla
- 60 ml de diluyente de muestras I (solución verde); contiene suero bovino de ternero*
- 0,250 ml de suero calibrador; la concentración de anticuerpos anti-dsADN en UA/ml y UI/ml se especifica en la etiqueta del frasco*
- 0,250 ml de suero de control positivo; el rango de la concentración de anticuerpos anti-dsADN en UA/ml y UI/ml se especifica en la etiqueta del frasco*
- 0,250 ml de suero de control normal; el rango de la concentración de anticuerpos anti-dsADN en UA/ml y UI/ml se especifica en la etiqueta del frasco*
- 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgG/IgM humanas (de cabra) y HRP (solución roja); contiene un 0,01% de timerosal y sulfato de gentamicina como conservantes
- 15 ml de sustrato de un componente (TMB y H₂O₂); listo para su uso
- 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N)
- 2 botellas de 30 ml de concentrado de lavado (PBS 33x)

*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro

1. El material de origen humano empleado para preparar el calibrador y los controles incluidos con este equipo se ha examinado y resultó negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH I y II requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables al manipular los reactivos del equipo y lávese las manos minuciosamente después de su uso.
5. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.
6. La solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular y cutánea. Es posible la absorción a través de la piel. Use guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
7. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:
Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).

Irritante . Riesgo biológico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El suero es la muestra recomendada. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2 y 8°C. Si es necesario conservar las muestras durante más de 72 horas, deben congelarse a una temperatura igual o inferior a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida. No utilice suero o plasma hemolizado, icterico o lipémico, ya que puede producir resultados erróneos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales suministrados

Prueba de anticuerpos anti-dsADN REAADS; véase una lista completa en «Reactivos».

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua destilada para preparar una solución de lavado PBS (1 litro) y para poner a cero o borrar la lectura de la placa final del análisis
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 µl, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado
- Guantes desechables

- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de dispensar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C) y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones del calibrador, los controles y los sueros de prueba deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo de agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua para reactivos a este pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o a borrarse con respecto a aire o a un pocillo de agua.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión apretando una botella de plástico de punta ancha dentro del fondo de los micropocillos. Si un pocillo testigo con agua recibe PBS, no se produce ninguna interferencia. También puede utilizarse un sistema de lavado de placas de microvaloración automático.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de administrar las soluciones a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todos los calibradores, controles y muestras deben aplicarse en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este período de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No debe utilizarse Tween 20 ni otros detergentes en este ensayo.
13. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
14. No utilice reactivos provenientes de equipos con diferentes números de lote.

Preparación del reactivo

Solución de lavado (PBS): Mida 30 ml de concentrado para lavado (PBS 33x) y dilúyalos en agua para reactivos hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución PBS no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.

Procedimiento del ensayo

1. Debe procesarse un pocillo como control de reactivo testigo, para lo que se añade diluyente de muestras I sin suero al pocillo. Este pocillo se tratará de la misma forma que los pocillos de muestras en los siguientes pasos del ensayo. Los restantes pocillos permiten analizar 46 muestras de pacientes por duplicado en dos pocillos cada una, o 92 muestras de pacientes en pocillos individuales.
2. Retire de la gradilla las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.

3. Prepare una dilución 1:50 del calibrador, los controles y las muestras de pacientes en el diluyente de muestras I (solución verde); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 490 µl de diluyente de muestras I equivalen a una dilución de muestra de 1:50.
4. Añada 100 µl de cada dilución -calibrador, control y muestra de paciente- a los micropocillos correspondientes.
5. Añada 100 µl de diluyente de muestras I al pocillo de reactivo testigo.
6. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
7. Lave 4 veces con PBS. Cada pocillo debe llenarse con PBS en cada uno de los lavados. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. La gradilla debe presionarse por el centro de las partes superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Después del lavado final, seque con papel secante para retirar los restos de líquido de lavado. No permita que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
8. Añada 100 µl de conjugado de IgG/IgM y HRP a los pocillos del calibrador, de los controles, del reactivo testigo y de las muestras de pacientes.
9. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos para desechar la solución de conjugado de enzimas y anticuerpos.
10. Lave 4 veces con PBS como en el paso 7. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
11. Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
12. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad de añadido del sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y la solución incolora permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a aire o a un pocillo testigo de agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm (y a referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble). Los valores de la D.O. deben leerse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Resultados

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados del calibrador, los controles y las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero calibrador (especificada en UA/ml o UI/ml en la etiqueta del frasco) por la D.O. o la media de la D.O. del suero calibrador.
3. Para obtener un valor de concentración en UA/ml o UI/ml, multiplique la D.O. o la media de la D.O. de cada uno de los controles y de las muestras de pacientes por el factor de conversión.

<p>Factor de conversión =</p> $\frac{\text{Concentración de anticuerpos anti-dsADN del calibrador}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador (D.O.)}}$ <p>Concentración de anticuerpos anti-dsADN de la muestra =</p> $\text{Factor de conversión} \times \text{absorbancia de la muestra (D.O.)}$

4. El valor de conversión debe calcularse para el calibrador en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo, los resultados obtenidos no serán válidos.
5. Las muestras con concentraciones de anticuerpos anti-dsADN de más de 100 UA/ml pueden especificarse como «más de 100 UA/ml», y las de más de 450 UI/ml, como «más de 450 UI/ml».

REAADS® Anti-dsDNA Quantitative Test Kit

Per uso diagnostico in vitro

Un dosaggio immunoenzimatico ELISA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-dsDNA della classe delle IgG/IgM nel siero umano.

USO PREVISTO

Per la rilevazione e la determinazione quantitativa degli anticorpi della classe delle IgG/IgM diretti contro l'acido desossiribonucleico a doppia elica (dsDNA) nel quadro della diagnosi e della gestione del lupus eritematoso sistemico (LES).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. I campioni di siero, i calibratori e i controlli diluiti vengono incubati in micropozzetti rivestiti con dsDNA, consentendo agli anticorpi anti-dsDNA presenti nel campione di reagire con l'antigene immobilizzato. Dopo la rimozione mediante lavaggio delle proteine sieriche non legate, vengono aggiunti gli anticorpi specifici per le IgG e le IgM umane marcati con perossidasi di rafano (HRP), per dar luogo alla formazione di complessi con gli anticorpi legati al dsDNA. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene dosato mediante aggiunta di una singola soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2) come substrato cromogeno. Nei pozzetti si sviluppa una colorazione di intensità proporzionale alla concentrazione sierica degli anticorpi anti-dsDNA.

I risultati si ottengono leggendo in uno spettrofotometro la densità ottica (o assorbanza) di ciascun pozzetto. Il kit include un siero di calibrazione con la concentrazione di anticorpi anti-dsDNA espressa in AU/ml (unità arbitrarie standardizzate in base a una preparazione di riferimento del Centers for Disease Control) o in IU/ml (unità internazionali standardizzate in base a una preparazione di riferimento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità). Dividendo il valore della concentrazione del calibratore per il valore dell'assorbanza di tale calibratore si ottiene un fattore di conversione. I valori di densità ottica dei controlli e dei campioni dei pazienti vengono moltiplicati per il fattore di conversione per ottenere i valori delle concentrazioni anticorpali espressi in AU/ml o IU/ml.

REAGENTI

Conservare a 2-8°C. Non congelare.

Ciascun kit di analisi REAADS per gli anticorpi anti-dsDNA a 96 micropozzetti contiene i seguenti reagenti **(i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit)**.

- 12 strisce (con telaio) da 1X8 micropozzetti rivestite con dsDNA stabilizzato (timo di vitello)
- 60 ml di diluente per campione I (soluzione verde); contiene siero di vitello*
- 0,250 ml di siero di calibrazione; vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione degli anticorpi anti-dsDNA espressa in AU/ml e IU/ml*
- 0,250 ml di siero di controllo positivo; vedere l'etichetta della fiala per il range di concentrazione degli anticorpi anti-dsDNA espresso in AU/ml e IU/ml*
- 0,250 ml di siero di controllo normale; vedere l'etichetta della fiala per il range di concentrazione degli anticorpi anti-dsDNA espresso in AU/ml e IU/ml*
- 15 ml di soluzione anticorpale (rossa) contenente anticorpi di capra anti-IgG/IgM umane coniugati con HRP; contiene lo 0,01% di timerosal e gentamicina solfato come conservanti
- 15 ml di substrato monocomponente (TMB e H_2O_2); pronto per l'uso
- 15 ml di soluzione di arresto (acido solforico 0,36 N)
- 2 x 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS)

*** ATTENZIONE - Contiene sodio azide**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. Il materiale di origine umana usato per la preparazione del calibratore e dei controlli inclusi in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti dell'FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante. È stato riportato che il sodio azide può formare azidi di rame e di piombo quando viene lasciato a contatto con questi metalli. Tali composti azidici sono esplosivi. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere sciacquate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
6. La soluzione di substrato mono-componente può causare irritazione agli occhi e alla cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Usare i guanti quando si maneggia il substrato e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
7. Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46).

Irritante . Rischio biologico .

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero è la matrice preferita. Il sangue va raccolto per venipuntura ed il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo la coagulazione. Se non vengono analizzati immediatamente, i campioni vanno conservati a 2-8°C. Se devono essere conservati per più di 72 ore, i campioni vanno congelati a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non usare siero o plasma emolizzati, itterici o lipemici, poiché queste condizioni possono produrre risultati errati. Campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima del test.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit di analisi REAADS per gli anticorpi anti-dsDNA; vedere la sezione "Reagenti" per un elenco completo dei componenti.

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata per preparare la soluzione di lavaggio PBS (1 litro) e per tarare o azzerare il lettore della piastra nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di misurare tra 5 e 1000 con punte appropriate
- Vetreria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con la punta leggermente indietro per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico.
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbanza a 450 nm (possibilmente con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanali per versare in 8 pozzetti simultaneamente

Note procedurali

1. Portare i campioni di siero e i reagenti del kit a temperatura ambiente (18-26 °C) a mescolarli bene prima dell'uso; **evitare la formazione di schiuma**. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e dei campioni vanno eseguite solo immediatamente prima del dosaggio.
3. In ciascuna sessione di analisi, su ogni piastra, è possibile analizzare un singolo pozzetto bianco. A questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungervi invece 200 µl di acqua distillata immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Il lettore di piastre va programmato su "zero" o azzerato contro l'aria o contro il pozzetto bianco.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato, dirigere nel fondo dei pozzetti un getto forte di soluzione di lavaggio erogata da un flacone di plastica morbida con punta larga. Se nel pozzetto bianco viene dispensata della soluzione PBS, non si verifica alcuna interferenza. È anche possibile usare un sistema di lavaggio automatico delle piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - I residui di PBS possono causare un sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di effettuare il dosaggio simultaneo in 8 pozzetti. Ciò aumenta la rapidità dell'analisi e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi dell'analisi è importantissimo. Tutti i calibratori, i controlli e i campioni vanno aggiunti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve superare la quantità che può essere aggiunta entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia quando è terminata l'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e con la stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26 °C) possono generare risultati errati.
11. Quando si aprono i flaconi originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione crociata e batterica dei reagenti.
12. Per questa analisi, non utilizzare Tween 20 o detergenti di altro tipo.
13. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
14. Non utilizzare componenti di kit appartenenti a lotti differenti.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio (PBS): misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS) e portare a 1 l con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS inutilizzata in frigorifero a 2-8°C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione crociata o batterica.

Procedura di analisi

1. È necessario analizzare un pozzetto come bianco reagente; a tale pozzetto si aggiunge il diluente per campione I senza siero. Questo pozzetto sarà trattato come i pozzetti dei campioni in tutte le fasi successive del dosaggio. I pozzetti rimanenti sono sufficienti per il dosaggio in duplicato di 46 campioni o per il dosaggio singolo di 92 campioni prelevati da pazienti.
2. Staccare dal telaio tutte le strisce di micropozzetti non utilizzate e riporle nella busta in dotazione.
3. Con il diluente per campione I (soluzione verde), preparare una diluizione in rapporto 1:50 del calibratore, dei controlli e dei campioni prelevati da pazienti; ad esempio, aggiungere 10 µl di campione a 490 µl di diluente per campione I per ottenere una diluizione del campione in rapporto 1:50.
4. Dispensare 100 µl di calibratore, controllo e campione diluiti nei pozzetti appropriati.

5. Aggiungere 100 µl di diluente per campione I al pozzetto bianco reagente.
6. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di campione. Evitare di contaminare con i campioni gli altri pozzetti.
7. Lavare 4 volte con PBS. Per il lavaggio, ciascun pozzetto va riempito con PBS. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Per trattenere i moduli dei micropozzetti durante il lavaggio, afferrarne il telaio ponendo un dito sul bordo inferiore e uno sul bordo superiore. Dopo l'ultimo lavaggio, picchiare la piastra su carta assorbente per rimuovere il liquido di lavaggio residuo. Tra una fase di analisi e quella successiva, non consentire l'essiccazione dei pozzetti.
8. Aggiungere 100 µl di IgG/IgM coniugate con HRP ai pozzetti del calibratore, dei controlli, del bianco reagente e del campione.
9. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti per eliminare la soluzione di coniugato enzima-anticorpo.
10. Lavare 4 volte con PBS come indicato al punto 7. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
11. Aggiungere 100 µl di substrato a ciascun pozzetto e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere il substrato ai pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
12. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (acido solforico 0,36 N) a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità di dispensazione della soluzione di substrato. La soluzione di substrato blu diventa gialla, mentre la soluzione incolore rimane invariata. Azzerare il lettore di piastre contro l'aria o contro il pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm (con riferimento a 650 nm nel caso di fascio doppio). I valori di densità ottica devono essere misurati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

1. Se si sono analizzati il calibratore, i controlli e il campione in duplicato, calcolare le densità ottiche medie.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione del siero di calibrazione (espressa in AU/ml o in IU/ml e riportata sull'etichetta della fiala) per la densità ottica o per la densità ottica media del siero di calibrazione.
3. Moltiplicare la densità ottica o la densità ottica media di ciascun controllo e del campione del paziente per il fattore di conversione per ottenere un valore di concentrazione espresso in AU/ml o IU/ml.

<p>Fattore di conversione =</p> $\frac{\text{Concentrazione di anticorpi anti-dsDNA del calibratore}}{\text{Assorbanza dal calibratore (densità ottica)}}$ <p>Concentrazione di anticorpi anti-dsDNA del campione =</p> $\text{Fattore di conversione} \times \text{assorbanza del campione (densità ottica)}$
--

4. Per ciascuna sessione di analisi, calcolare il fattore di conversione. L'uso di un fattore di conversione di un altro dosaggio invalida i risultati.
5. I campioni con valori di anticorpi anti-dsDNA superiori a 100 AU/ml possono essere riportati come "superiori a 100 AU/ml"; quelli superiori a 450 IU/ml possono essere riportati come "superiori a 450 IU/ml".

Controllo di qualità

1. Per garantire il corretto funzionamento del kit, il valore della densità ottica del calibratore deve essere almeno 0,400. Un risultato di densità ottica del calibratore minore di 0,400 indica che il kit non è valido.
2. Quando lo spettrofotometro è stato tarato sul pozzetto bianco, la densità ottica del bianco reagente deve essere $\leq 0,100$. Valori più alti di 0,100 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori degli anticorpi anti-dsDNA ottenuti per i sieri di controllo devono rientrare nei range indicati sulle etichette delle rispettive fiale. Piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range sono accettabili.
4. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati da pazienti, se analizzati, devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per i campioni che hanno valori di assorbanza maggiori di 0,200.
5. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare i propri valori di cut-off per una determinata popolazione di pazienti. Come esempio, vedere la sezione "Valori attesi".
6. Assicurarsi che tutti i parametri del controllo di qualità siano stati osservati prima di refertare i risultati delle analisi.

VALORI ATTESI

Range di riferiment Meno di 26 AU/ml
 oppure
 Meno di 117 IU/ml

Il cut-off normale è stato definito come il valore medio espresso in AU/ml o IU/ml più due deviazioni standard derivato dall'analisi eseguita su un gruppo di campioni di siero provenienti da donatori sani.

LIMITI DEL DOSAGGIO

I valori della concentrazione degli anticorpi anti-dsDNA ottenuti mediante il presente dosaggio costituiscono esclusivamente uno strumento diagnostico ausiliario. Il medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altre procedure diagnostiche. Un livello elevato di anticorpi anti-dsDNA nel siero è solo uno degli undici criteri diagnostici per il LES.¹ Alcuni soggetti apparentemente normali e soggetti affetti da altre malattie reumatiche possono generare quantità rilevabili di anticorpi anti-dsDNA; tuttavia, tali livelli sono generalmente molto più bassi rispetto a quelli dei pazienti affetti da LES.⁸

Garanzia












Si garantisce che le prestazioni di questo prodotto corrispondono a quanto descritto nel presente foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per ottenere assistenza tecnica o per rivolgersi al servizio assistenza clienti, negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Dagli altri Paesi, chiamare il numero +1-303-457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519 o rivolgersi a un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Miescher P, Strässle R. New serological methods for the detection of LE factor. *Vox Sang* 2:283, 1957.
2. Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96:572, 1957.
3. Robbins WC, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96:575, 1957.
4. Seligmann M. Mise en évidence dans le sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé d'une substance déterminant une réaction de précipitation avec l'acide désoxyribonucléique. *CR Acad Sci (Paris)* 245:243, 1957.
5. Tan EM. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25(11):1271, 1982.
6. Weinstein A, Bordwell B, Stone B, Tibbetts C, Rothfield NF. Antibodies to native DNA and serum complement (C3) levels: application to diagnosis and classification of systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 74:206, 1983.
7. Glass D, Shur P. Autoimmunity and Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity: Genetic, Immunologic, Virologic and Clinical Aspects. N Talal, M.D., ed* (Academic Press: New York) 531, 1977.
8. Schoenfeld Y, André-Schwartz J, Stollar BD, Schwartz RS. Anti-DNA Antibodies. *Systemic Lupus Erythematosus. RG Lahita, M.D. PhD., ed* (John Wiley and Sons: New York) 213, 1987.
9. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA, Silis G, Gharavi AE, Moutsopoulos HM. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. *Clin Exp Rheum* 5:247, 1987.
10. Swaak AJG, Groenwold J, Bronsfield W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 45:359, 1986.
11. Wilson M. Antinuclear Antibodies and Anticytoplasmic Antibodies in Lupus Erythematosus. *Dubois' Lupus Erythematosus, 3rd edition DJ Wallace and EL Dubois, ed* (Lea and Febiger: Philadelphia) 227, 1987.
12. Tan EM, Fritzler MJ, Hardin JA, McDougal JS, et al. Comprehensive Report: Reference Sera for Antinuclear Antibodies I. Antibodies to Native DNA, Sm, Nuclear RNP, SS-B/La, SS-A/Ro, Scl-70, Nucleoli, and Centromere/Kinetochore. Committee on Antinuclear Antibody Serology, The Arthritis Foundation, Atlanta, GA, 1984.

SYMBOL LEGEND

										
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Irritant	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtigter	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Reizend	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Irritant	Risque biologique	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Irritante	Riesgo biológico	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Irritante	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstraße 80
 D-66386 St. Ingbert/Germany



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA

READS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
 © 2005, Corgenix, Inc.
 US Patent # 5,183,735

13022901 14
 Effective: 2006-10-30